Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Stoffwechselwirkungen von Resochin und Primaquine in roten Blutzellen

(ein Beitrag zum Mechanismus der primaquine-induzierten Hämolyse)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sieglinde Lüer
aus Zeulenroda/Thüringen

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0031

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Stoffwechselwirkungen von Resochin und Primaquine in roten Blutzellen

(ein Beitrag zum Mechanismus der primaquine-induzierten Hämolyse)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sieglinde Lüer
aus Zeulenroda/Thüringen

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.D. Waller
(Professor Dr. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lembeck

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung ..... 1 - 3

II. Methodik ..... 4 - 9

III. Versuche und Ergebnisse

1. Laktat- und Pyruvatbildung sowie energiereiche Phosphate in Erythrozyten unter der Einwirkung von Resochin und Primaquine ..... 10 - 12

2. Oxydation reduzierter Pyridinnukleotide im isolierten System mit und ohne Zusatz von Hämolysat in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration ..... 13 - 15

3. Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeiten in nitrierten Erythrozyten mit und ohne Resochinzusatz ..... 15 - 18

4. Methämoglobinbildung durch Resochin und Primaquine in Blutzellen ..... 21 - 23

IV. Diskussion der Ergebnisse ..... 24 - 28

V. Zusammenfassung 29

VI. Literaturverzeichnis ..... 30 - 36

I. EINLEITUNG

Durch Anwendung neuer, quantitativer biochemischer Untersuchungsmethoden gelang es in den vergangenen 15 Jahren, für eine große Gruppe unter den medikamentös ausgelösten hämolytischen Anämien verschiedene Stoffwechseldefekte in den roten Blutzellen nachzuweisen. Nachdem man früher glaubte, daß es sich um rein erworbene hämolytische Anämien handelt, ausgelöst durch Medikamente wie Plasmochin, Primaquine, Furadantin, Sulfonamide, aromatische Amino- und Nitroverbindungen und verschiedene Leguminosen (Favabohnen), zeigten Stoffwechseluntersuchungen, daß nur das Zusammentreffen des hereditären Stoffwechseldefektes und der exogenen Faktoren zur Hämolyse führt.

CORDES (14) beschrieb 1926 erstmals eine akute Hämolyse bei einem Kranken nach Plasmochingabe. Später wurden von den Autoren ANNY (2), FICACCI (16), MANITOLD (29) und SEIN (43) weitere Beobachtungen über hämolytische Krisen nach Plasmochinmedikation publiziert.

BEUTLER et al. (5) führten Untersuchungen an Erythrozyten primaquinesensitiver Neger Nordamerikas durch und konnten in den roten Blutzellen eine Erniedrigung des Glutathiongehaltes sowie dessen Instabilität nach Inkubation mit Azetylphenylhydrazin zeigen. Die von BEUTLER et al. (5) beobachteten Störungen im Glutathionstoffwechsel lösten zahlreiche Untersuchungen an den Erythrozyten drogensensitiver Patienten aus. Auch andere Untersucher, so CARSON et al. (12), GROSS (17), STERNSCHUSS-KOSOWER (44), WAGNER et al. (47) und WALLER et al. (53) teilten in der Folge mit, daß Patienten, die sensibel gegen die genannten Medikamente, Chemikalien und Leguminosen waren, eine Erniedrigung und Instabilität des intraerythrozytären Glutathions (GSH) aufwiesen. Interessant ist, daß nach BEUTLER unter den Antimalariamitteln vor allem die Derivate des 8-Aminochinolins und nicht des 4-Aminochinolins Hämolysen auszulösen vermochten.

1956 machten CARSON, FLANAGAN, ICKES und ALVING (12) die Beobachtung, daß sich durch Zusatz von 6-Phosphoglukonat und NADP zu den Hämolysaten primaquinesensitiver Erythrozyten Glutathion (GSSG) reduzieren ließ, während die Reduktion nach Zusatz von Glukose-6-Phosphat ausblieb. Auf Grund dieser Beobachtung schlossen die Autoren auf einen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel in den primaquinesensitiven Erythrozyten.

WALLER, LÖHR und TABATABAI (53) berichteten 1957 erstmals über das spontane Auftreten einer Hämolyse bei einem Iraner, in dessen Erythrozyten keine Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Als Folge dieses Enzymdefektes fanden WALLER et al. eine deutliche Erhöhung der intraerythrozytären Konzentration von oxydiertem Triphosphopyridinnukleotid (NADP), da dieses nicht zu $NADPH_2$ reduziert werden konnte. Auch die Katalysierung der Methämoglobinreduktion durch reversibel reduzierbare Farbstoffe (z.B. Toluidinblau), die an die Bildung von $NADPH_2$ gebunden ist, war stark herabgesetzt.

Von SZEINBERG (46) erschien 1957 eine Arbeit, in der dieser über das Auftreten einer Hämolyse bei orientalischen Juden nach Genuß von Favabohnen sowie Einnahme von Sulfonamiden, Plasmochin und p-Aminosalicylsäure berichtete. In den Erythrozyten dieser Probanden fehlte ebenfalls die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Die Mitteilung eines anderen intraerythrozytär gelegenen Enzymdefektes mit Hämolyseerscheinungen erfolgte 1961 durch OORT, LOOS und PRINS (35). Weitere Beobachtungen dieser Art wurden von LÖHR und BAUM (24), WALLER und GEROK (54) sowie BOIVIN und GALAND (7) beschrieben. Es handelte sich um einen Mangel an reduziertem und oxydiertem Glutathion bei normaler Aktivität der an der Glutathionreduktion beteiligten Enzyme. Biochemisch lag ein Mangel an Glutathionsynthetase vor. Einmal kam es nach oraler Einnahme eines Latschenkiefernextraktes zu einer schweren Hämolyse, bei einer anderen Patientin wurde durch Radiumeinlagen und Pendelkonvergenzbestrahlung wegen eines Karzinoms des Kollum uteri eine lebensbedrohliche Hämolyse ausgelöst.

1962 beschrieben LÖHR und WALLER (26) erstmals ein Krankheitsbild mit Glutathionreduktase-Mangel. Nach Behandlung mit den Medikamenten Resochin, Primaquine, Sulfonamide, Butazolidin, Tomanol, Irgapyrin, Chloramphenicol trat bei den Defektträgern fast regelmäßig eine Hämolyse auf. Nach Absetzen der Substanzen beobachteten die Autoren zum Teil eine spontane Remission oder Teilremission.

Ein weiterer sehr seltener Enzymdefekt in den NADP reduzierenden Reaktionen, der eine schwere hämolytische Anämie zur Folge haben kann, ist der Mangel von 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, über den LÖHR und LAUSECKER (25) sowie SCIALOM und Mitarbeiter (42) berichteten. Bei diesem Enzymdefekt trat die Hämolyse ohne Medikamentenexposition direkt nach der Geburt auf.

Um die Klärung der Stoffwechselstörungen und den Zusammenhang zwischen Stoffwechseldefekt in den Erythrozyten und der durch die Medikamente ausgelösten Hämolyse haben sich zahlreiche Untersucher wie BEUTLER (4, 5), BREWER (9), CARSON (12), GROSS (17), JAFFÉ (18), STERNSCHUSS-KOSOWER (44), LARIZZA (23), LÖHR (26, 27, 28), SZEINBERG (46),

WAGNER (47, 48, 49, 50, 51), WALLER (53, 55, 56, 57) und deren Mitarbeiter bemüht. Gegenstand der Untersuchungen waren vor allem die Änderung des Kationengehaltes, der Glykolyse und des Reduktionsgrades der Pyridinnukleotide in normalen Erythrozyten und roten Blutzellen mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel unter der Einwirkung von Azetylphenylhydrazin und Primaquine. Die Ergebnisse sind nicht einheitlich, zum Teil sogar widersprechend.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, die Stoffwechselwirkungen von Antimalariamitteln in normalen roten Blutzellen und im isolierten System zu untersuchen und dadurch einen weiteren Beitrag zum Verständnis der medikamenteninduzierten Hämolyse zu liefern. Als Beispiele wurden für die weniger hämolysierenden 4-Aminochinolinderivate das Resochin (Chloroquine) und für die bei GSH-Mangelträgern stark hämolytisch wirksamen 8-Aminochinolinderivate das Primaquine gewählt.

Resochin (Chloroquine): 4-(4'-Diäthylamino-1'-methylbutylamino)-7-chlor-chinolin
Primaquine: 8-(4'-Amino-1'-methylbutylamino)-6-methoxychinolin

II. METHODIK

Die Untersuchungen wurden an gewaschenen Erythrozyten durchgeführt. Das Blut wurde in 3,8%ige Natriumzitratlösung im Verhältnis 1 : 10 aus der gestauten Armvene aufgenommen. Nach Abtrennung des Serums wurden die Erythrozyten zweimal in physiologischer Kochsalzlösung und einmal in Phosphat-Ringerlösung pH 7,4 auf der Zentrifuge gewaschen. Die Erythrozyten wurden in Phosphat-Ringerlösung pH 7,4 suspendiert und auf eine Erythrozytenzahl von 1,5 - 2,0 Mill. je cmm eingestellt. Die Methämoglobin- und Gesamthamoglobinbestimmung erfolgte nach der CO-Methode von KIESE (22a).
Zur Bestimmung der Erythrozytenzahl pro cmm wurden zwei Erythrozytenpipetten in je zwei Kammern nach Neugebauer ausgezählt.

1. Bestimmung der Glykolyse in Erythrozytensuspensionen:

(Angabe der endlichen Resochin- und Primaquinekonzentration in Mol/Liter)

Testansatz 1:

Erythrozytensuspension	10 ml	
3%ige Glukose	0,2 ml	
Primaquine- oder Resochin	0,2 ml	(1×10^{-3} M)
	bzw. 0,1 ml	(1×10^{-4} M)

Leeransatz: gleiche Zusammensetzung ohne Primaquine- bzw. Resochinzusatz.

Inkubation der Ansätze 10 Minuten und 2 Stunden, 3 Stunden und 4 Stunden.
Temperatur: 37° C.
Nach Inkubation Enteiweißung mit 6%iger, eisgekühlter Perchlorsäure im Verhältnis 1 : 1 und Abtrennung des Niederschlages für 10 Minuten auf der Zentrifuge bei ca. 3000 U/Minute.
Energiereiche Phosphate sowie Pyruvat und Laktat wurden bei pH 7,5 und 25° C mit einer Testkävette 2,0, Schichtdicke d = 1 cm im Photometer Eppendorf bei der Wellenlänge 366 mμ bestimmt. Errechnung der Metabolite mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten.

a) ATP-Bestimmung:

Reaktionsschema:

$$ATP + 3\text{-}PG \xrightleftharpoons{PGK} ADP + 1{,}3\ PG\text{-}P$$

Testzusammensetzung:

1. Triäthanolaminpuffer 0,1 M, pH 7,6 Magnesiumsulfat 0,004 M	2,40 ml
2. 0,006 M 3-PG 0,012 M NADH	0,04 ml
3. Überstand nach Enteiweißung	0,20 ml
4. 4 mg GAPDH/ml, 1 mg PGK/ml	0,04 ml

b) ADP/AMP-Bestimmung:

Reaktionsschema:

1. $AMP + ATP \xrightleftharpoons{MK} 2\ ADP$
2. $ADP + PEP \xrightleftharpoons{PK} ATP + Pyruvat$
3. $Pyruvat + NADH \xrightleftharpoons{LDH} Laktat + NAD$

Testzusammensetzung:

1. Überstand nach Enteiweißung	4,00 ml
0,43 M Triäthanolamin HCL 0,55 M K_2CO_3	1,00 ml
2. Filtrat	2,00 ml
3. 0,01 M Phosphoenolpyruvat 1,3 M KCL 0,4 M $MgSO_4$	0,15 ml
4. 0,009 M NADH	0,10 ml
5. 1 mg LDH/ml	0,04 ml
6. 1 mg PK/ml	0,04 ml
7. 2 mg MK/ml	0,06 ml

c) Pyruvatbestimmung:
Reaktionsschema:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Laktat} + \text{NAD}$$

Testzusammensetzung:

1. Enteiweißter Überstand	4,50 ml
1,1 M Dikaliumhydrogenphosphat	1,50 ml
Gut mischen, 10 Minuten im Eisbad stehen lassen und dann filtrieren.	
2. Filtrat	2,00 ml
3. 0,012 M NADH	0,05 ml
4. 0,75 mg LDH/ml	0,10 ml

d) Laktat-Bestimmung:
Reaktionsschema:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Laktat} + \text{NAD}$$

Im alkalischen Milieu wird Pyruvat vom Hydrazin abgefangen.

Testzusammensetzung:

1. 0,5 M Glyzinpuffer pH 9,0 0,4 M Hydrazin	2,00 ml
2. Überstand nach Enteiweißung	0,10 ml
3. 0,027 M NAD	0,20 ml
4. 2 mg LDH/ml	0,06 ml

2. Manometrische Fermentbestimmungen:

Lösungen: Phosphat-Ringerlösung pH 7,4
Zusammensetzung: 9 Teile einer Lösung von 8,5 g NaCl, 0,23 g KCl und 0,25 g $CaCl_2$ im Liter und 1 Teil m/15 Phosphatpufferlösung pH 7,4.
Phosphatpufferlösung: m/15, pH 7,4 nach Sörensen.

Herstellung der methämoglobinhaltigen Erythrozyten:
20 ml Zitratblut wurden mit 10 ml einer 1%igen $NaNO_2$-Lösung versetzt, gut

verrührt und 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das überschüssige Nitrit wurde danach durch zweimaliges Waschen der Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung und einmaliges Waschen in Phosphat-Ringerlösung pH 7,4 auf der Zentrifuge abgetrennt. Nach der Nitrierung lag der Blutfarbstoff zu 94 - 98% als Methämoglobin vor.

Herstellung der Hämolysate:
Gewaschene Erythrozyten wurden im Verhältnis 1 : 1 mit destilliertem Wasser versetzt und etwa eine Stunde im Eisfach des Kühlschrankes aufbewahrt. Nach schnellem Auftauen Abtrennung ungelöster Bestandteile auf der Zentrifuge (10 Minuten bei 3000 U/Min.). Hämoglobinkonzentration der Hämolysate etwa 12 g/100 ml.

Gerät:
Warburg-Apparat der Fa. Braun, Melsungen, Modell Z 85. Es wurden kegelförmige Reaktionsgefäße mit Einsatz im Hauptraum und Seitenbirne mit drehbarem Schliffventil verwendet. Das Gefäßvolumen betrug ca. 13 ml.
Die Messungen wurden bei 37° C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 110/Minute (Amplitude 2,5 cm) durchgeführt. Die Bestimmung der Methämoglobinreduktaseaktivität erfolgte unter Sauerstoff, die der Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeit unter Kohlenoxyd, Sauerstoff und Luft. Das Kohlenoxyd wurde durch je eine Waschflasche mit 30%iger Pyrogallol-Lösung und 3 n NaOH-Lösung geleitet. Die Substrate wurden nach einem Vorlauf von 10 Minuten zum Temperaturausgleich eingekippt.
Zehnminütige Ablesungen über eine Stunde.

A. Untersuchungen am isolierten System:

(Angabe der endlichen Resochinkonzentration in Mol/Liter)

Testansatz 1:

Hauptraum:	m/15 Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4	
	Hämolysatzusätze von 0,2 ml, 0,4 ml, 0,8 ml	
	G-6-PDH	0,02 ml (2,8 I.U.)
	Resochin	0,67 ml (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M)
Einsatz:	1 n NaOH	0,20 ml
Birne:	NADP	0,10 ml (2×10^{-6} M)
	G-6-P-Na	0,17 ml (2×10^{-6} M)
Gesamtvolumen:		2,20 ml
Leeransatz:	gleiche Zusammensetzung ohne Resochinzusatz, Volumen durch Puffer ergänzt.	
Gasraum:	O_2	

Testansatz 2:

Hauptraum:	m/15 Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4	
	G-6-PDH	0,02 ml (2,8 I.U.)
	Resochin	0,67 ml (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M)
Einsatz:	1 n NaOH	0,20 ml
Birne:	NADP	0,10 ml (2×10^{-6} M)
	G-6-P-Na	0,17 ml (2×10^{-6} M)
Leeransatz:	gleiche Zusammensetzung ohne Resochinzusatz, Volumen durch Puffer ergänzt.	
Gasraum:	O_2	

Testansatz 3:

Hauptraum:	m/15 Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4	
	Hämolysatzusätze von 0,2 ml, 0,4 ml, 0,8 ml	
	GAPDH	0,02 ml (7,2 I.U.)
	Resochin	0,67 ml (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M)
Einsatz:	1 n NaOH	0,20 ml
Birne:	NAD	0,10 ml (2×10^{-6} M)
	TPE	0,17 ml (Original nach C.F. Boehringer, Mannheim, neutralisiert auf pH 7,0)
Gesamtvolumen:		2,20 ml
Leeransatz:	gleiche Zusammensetzung ohne Resochinzusatz, Volumen durch Puffer ergänzt.	
Gasraum:	O_2	

Testansatz 4:

Hauptraum:	m/15 Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4	
	GAPDH	0,02 ml (7,2 I.U.)
	Resochin	0,67 ml (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M)
Einsatz:	1 n NaOH	0,20 ml
Birne:	NAD	0,10 ml (2×10^{-6} M)
	TPE	0,17 ml (Original n. C.F. Boehringer, Mannheim, neutralisiert auf pH 7,0)
Gesamtvolumen:		2,20 ml
Leeransatz:	gleiche Zusammensetzung ohne Resochinzusatz, Volumen ergänzt durch Puffer.	
Gasraum:	O_2	

B. Untersuchungen an Erythrozytensuspensionen:

(Angabe der endlichen Resochinkonzentration in Mol/Liter)

Testansatz 1:

Hauptraum:	nitrierte Erythrozytensuspension		2,00 ml
	4%ige Glukoselösung		0,15 ml
Einsatz:	1 n NaOH	0,20 ml	
Birne:	Resochin	0,10 ml (5×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M)	
Gesamtvolumen:		2,45 ml	

Leeransatz: gleiche Zusammensetzung ohne Resochinzusatz.
Gasraum: CO, O_2 und Luft

Testansatz 2:

Wie Testansatz 1, nur statt 0,15 ml 4%iger Glukoselösung 4%iges Na-Laktat zugesetzt.

Erklärung der verwendeten Abkürzungen:

NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
TPE	Triosephosphatester
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
PG	Phosphoglyzerat
PGK	Phosphoglyzerat-Kinase
MK	Myokinase
PK	Pyruvatkinase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
GSSG	Glutathion
GSH	reduziertes Glutathion

III. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

1. Laktat- und Pyruvatbildung sowie energiereiche Phosphate in Erythrozyten unter der Einwirkung von Resochin und Primaquine:

Die Laktat- und Pyruvatbildung wurde an Suspensionen gewaschener Erythrozyten in Phosphat-Ringerlösung pH 7,4 mit 250 mg% Glukose bei 37° C gemessen. Am Ende jedes Versuches wurden zusätzlich die energiereichen Phosphate bestimmt. Die Versuche wurden ohne Zusatz von Medikamenten und nach Zugabe von 1×10^{-3} M bzw. 5×10^{-4} M Resochin bzw. Primaquine durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Aus der Zusammenstellung in den Tabellen 1 und 2 ergibt sich, daß die Glykolyserate in den Erythrozyten ohne Medikamentenzusatz je Stunde über eine Inkubationszeit bis zu 4 Stunden konstant blieb. Auch der Gehalt an energiereichen Phosphaten änderte sich nicht signifikant. Nach Zusatz von Primaquine bzw. Resochin nahm die Summe der gebildeten fixen Sauren in Abhängigkeit von der Medikamentenkonzentration, jedoch unabhängig von der Inkubationsdauer, mäßig ab, wobei unter Primaquine ein stärkeres Absinken zu beobachten war als unter Resochin. Hierbei verschob sich das Verhältnis von Laktat zu Pyruvat stark zugunsten des Pyruvats. Auch hier wurden unter Primaquinezusatz niedrigere Quotienten erreicht als unter Resochinzusatz.

Tabelle 1

Glykolyse und energiereiche Phosphate in normalen Erythrozyten während der Inkubation mit Resochin

(Stoffwechselgrößen in Mikromol / 10^{11} Erythrozyten , n = 5)

nach 2stündiger Inkubation

Resochin-Konzentration	Laktat/Std.	Pyruvat/Std.	Summe fixer Säuren/Std.	Laktat / Pyruvat	ATP	ADP	AMP
ohne Zusatz	32,5	2,0	34,5	16,2	16,1	2,4	1,2
5×10^{-4} M	29,0	4,1	33,1	7,1	15,0	2,6	1,0
1×10^{-3} M	24,8	5,0	29,8	4,9	13,8	2,6	1,2

nach 3stündiger Inkubation

ohne Zusatz	32,9	2,0	34,9	16,5	15,6	2,6	1,3
5×10^{-4} M	29,6	4,3	33,9	6,9	14,8	3,0	1,4
1×10^{-3} M	26,5	5,1	31,6	5,0	12,9	3,4	1,5

nach 4stündiger Inkubation

ohne Zusatz	32,0	2,1	34,1	15,4	14,7	2,6	1,2
5×10^{-4} M	26,5	4,0	30,5	6,6	13,2	2,9	1,4
1×10^{-3} M	20,1	4,9	25,0	4,5	12,8	2,8	1,4

Tabelle 2

Glykolyse und energiereiche Phosphate in normalen Erythrozyten während der Inkubation mit Primaquine

(Stoffwechselgrößen in Mikromol / 10^{11} Erythrozyten)

nach 2stündiger Inkubation n = 10

Primaquine-Konzentration	*Laktat/Std.*	*Pyruvat/Std.*	*Summe fixer Säuren/Std.*	*Laktat / Pyruvat*	*ATP*	*ADP*	*AMP*
ohne Zusatz	30,4	1,8	32,2	16,9	15,9	2,1	1,3
5×10^{-4} M	24,5	6,6	31,1	3,7	14,5	2,3	1,2
1×10^{-3} M	16,0	8,8	24,8	2,0	13,5	2,8	1,2

nach 3stündiger Inkubation n = 5

ohne Zusatz	32,0	2,2	34,2	16,0	17,8	2,5	1,2
5×10^{-4} M	22,0	7,2	29,2	3,1	14,3	3,2	1,4
1×10^{-3} M	16,0	8,9	24,9	1,8	12,7	3,4	1,4

nach 4stündiger Inkubation n = 5

ohne Zusatz	32,5	2,2	34,5	16,0	14,4	2,0	1,0
5×10^{-4} M	21,0	7,2	29,0	2,6	13,0	2,6	1,3
1×10^{-3} M	14,9	8,9	24,1	1,6	12,0	2,3	1,2

2. Oxydation reduzierter Pyridinnukleotide im isolierten System mit und ohne Zusatz von Hämolysat in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration:

Zunächst wurde die Geschwindigkeit der Oxydation von NADH zu NAD und von NADPH zu NADP mit und ohne Hämolysatzusatz mit steigender Resochinkonzentration unter reinem Sauerstoff manometrisch gemessen.
Die Bildung des reduzierten NAD erfolgte in der oxydierenden Gärungsreaktion durch Zusatz von oxydierendem Gärungsferment (Glyzeraldehyd-3-P-Dehydrogenase) und Triosephosphatester. Im Ansatz mit NADPH wurde das NADP durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit Glukose-6-Phosphat als Substrat reduziert. Die Oxydation der reduzierten Pyridinnukleotide wurde als O_2-Aufnahme bestimmt. Die Sauerstoffaufnahme durch das gelöste Resochin allein und durch das Hämolysat wurde in Parallelansätzen ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

Tabelle 3

Oxydation von NADH (n = 5)
Oxydationsgeschwindigkeit in 10^{-8} M O_2/Std. u. 1 ml Ansatz
Testzusammensetzung siehe Methodik Testansätze 3 und 4

	Resochinkonzentration je Liter		
Hämolysatzusatz	1×10^{-3} Mol	1×10^{-4} Mol	ohne Resochin
0,8 ml	158	134	18
0,4 ml	116	104	13
0,2 ml	38	31	14
ohne Hämolysat	30	24	18

Tabelle 4

Oxydation von NADPH (n = 5)
Oxydationsgeschwindigkeit in 10^{-8} M O_2/Std. u. 1 ml Ansatz
Testzusammensetzung siehe Methodik Testansätze 1 und 2

	Resochinkonzentration je Liter		
Hämolysatzusatz	1×10^{-3} Mol	1×10^{-4} Mol	ohne Resochin
0,8 ml	52	33	18
0,4 ml	32	26	15
0,2 ml	30	25	15
ohne Hämolysat	28	22	12

Aus den Tabellen 3 und 4 geht hervor, daß in den Ansätzen ohne Hämolysatzusatz bereits mit steigender Resochinkonzentration eine mäßige Zunahme der Sauerstoffaufnahme durch die Oxydation von NADPH und NADH auftritt. Die Oxydationsgeschwindigkeit von NADPH ist dabei geringfügig höher als die von NADH. Nach Zusatz von Hämolysaten nimmt die Sauerstoffaufnahme in beiden Ansätzen erheblich zu, ohne daß eine Korrelation zu den zugesetzten Hämolysatvolumina besteht. Die Steigerung der O_2-Aufnahme durch Hämolysatzusätze ist in den Versuchen mit NADH und Resochin wesentlich großer als in den Ansätzen mit NADPH und Resochin.

In allen Ansätzen mit Hämolysatzusatz wurde der Anstieg des Methamoglobins gemessen.

Tabelle 5

Methämoglobinbildung in den Ansätzen mit Zusatz von NAD, GAPDH, TPE. Hb-3-Werte in % des Gesamthämoglobins. (n = 5)

	Hämolysatzusatz					
	0,2 ml		0,4 ml		0,8 ml	
Resochinkonz.	0 Min.	80 Min.	0 Min.	80 Min.	0 Min.	80 Min.
1×10^{-3} Mol	0,9	4,6	1,1	4,7	0,9	3,7
1×10^{-4} Mol	0,9	2,8	1,1	3,5	0,9	2,7
ohne Resochin	0,9	1,3	1,1	2,3	0,9	1,7

Tabelle 6

Methamoglobinbildung in den Ansätzen mit Zusatz von NADP, G-6-PDH, G-6-P. Hb-3-Werte in % des Gesamthämoglobins. (n = 5)

	Hämolysatzusatz					
	0,2 ml		0,4 ml		0,8 ml	
Resochinkonz.	0 Min.	80 Min.	0 Min.	80 Min.	0 Min.	80 Min.
1×10^{-3} Mol	0,3	10,4	0,3	8,4	0,5	12,7
1×10^{-4} Mol	0,3	5,0	0,3	3,7	0,5	4,3
ohne Resochin	0,3	2,7	0,3	2,3	0,5	1,9

Die Ausgangskonzentration für das Methamoglobin (Hb-3) lag bei allen Ansätzen im Normbereich. Nach 80minütiger Inkubation unter reinem Sauerstoff findet man in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration eine Zunahme des Methamoglobins. Die Methamoglobinkonzentration in den Ansätzen mit NADP-Zusatz erreicht dabei höhere Werte als in den Ansätzen mit NAD-Zusatz.

3. Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeiten in nitrierten Erythrozyten mit und ohne Resochinzusatz:

In dieser Versuchsserie wurden die Methamoglobinreduktionsgeschwindigkeiten manometrisch unter Zusatz von Resochin gemessen. Die Untersuchungen wurden an nitrierten Erythrozyten durchgeführt. Der Methamoglobingehalt in den nitrierten Erythrozyten schwankte vor Zugabe des Resochins zwischen 92 und 98%. Als Substrat wurden sowohl Natrium-Laktat als auch Glukose zugesetzt. Im Gasraum befanden sich Kohlenoxyd, Sauerstoff oder Luft. Die Methamoglobinreduktionsgeschwindigkeit wurde aus der Bindung von Sauerstoff oder Kohlenoxyd durch das reduzierte Hämoglobin je Zeiteinheit errechnet. Die Aufnahme von 1 Äquivalent CO oder 3/4 Molen O_2 entsprechen dabei 1 Äquivalent reduziertem Methamoglobin. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 1 - 4 wiedergegeben.

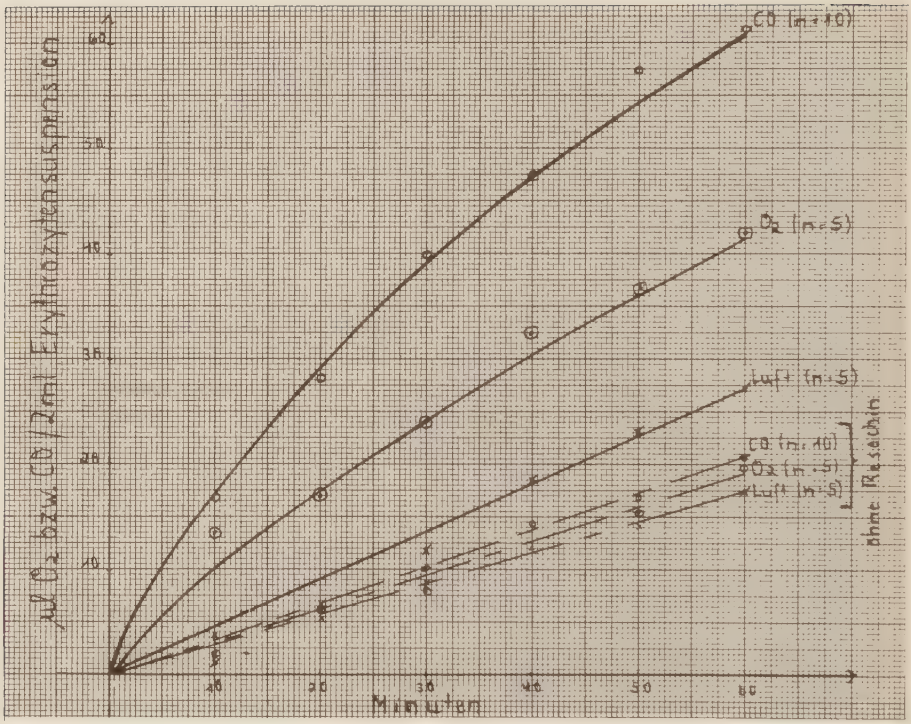

Abb. 1: Methämoglobinreduktion in Erythrozyten nach Zusatz von Resochin (5×10^{-3} M); Phosphat-Ringerlösung pH 7,4, 250 mg% Glukose; 2,2 Mill. Erythrozyten/cmm; 37° C

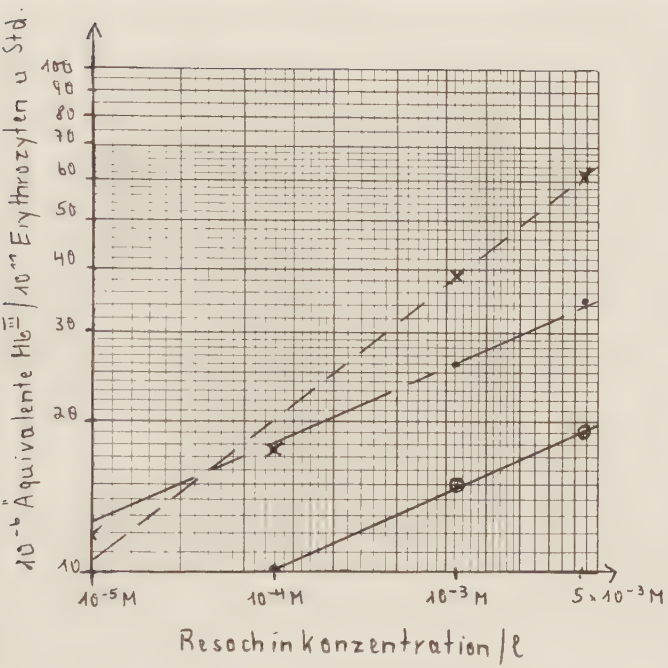

Abb. 2: Methämoglobinreduktion in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration.
Phosphat-Ringerlösung pH 7,4; 250 mg% Glukose; 2,2 Mill. Erythrozyten/cmm; 37° C.

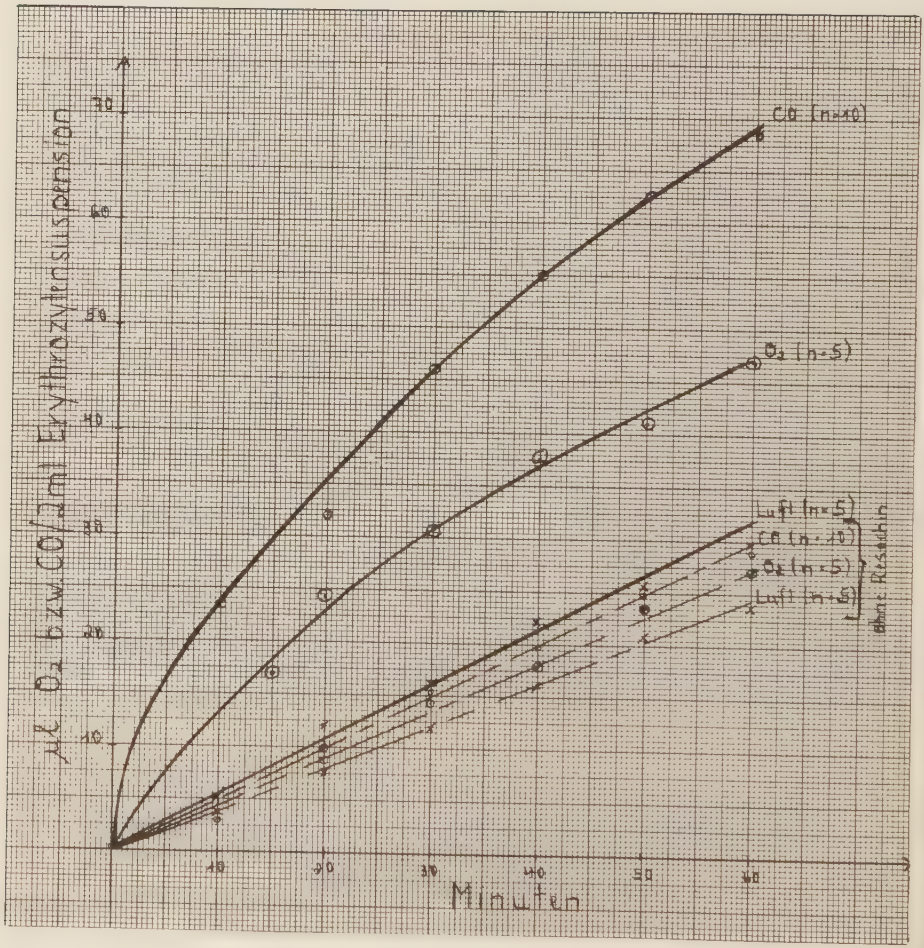

Abb. 3: Methämoglobinreduktion in Erythrozyten nach Zusatz von Resochin (5×10^{-3} Mol);
Phosphat-Ringerlösung pH 7,4;
245 mg% Na-Laktat; 2,4 Mill. Erythrozyten/cmm; 37° C

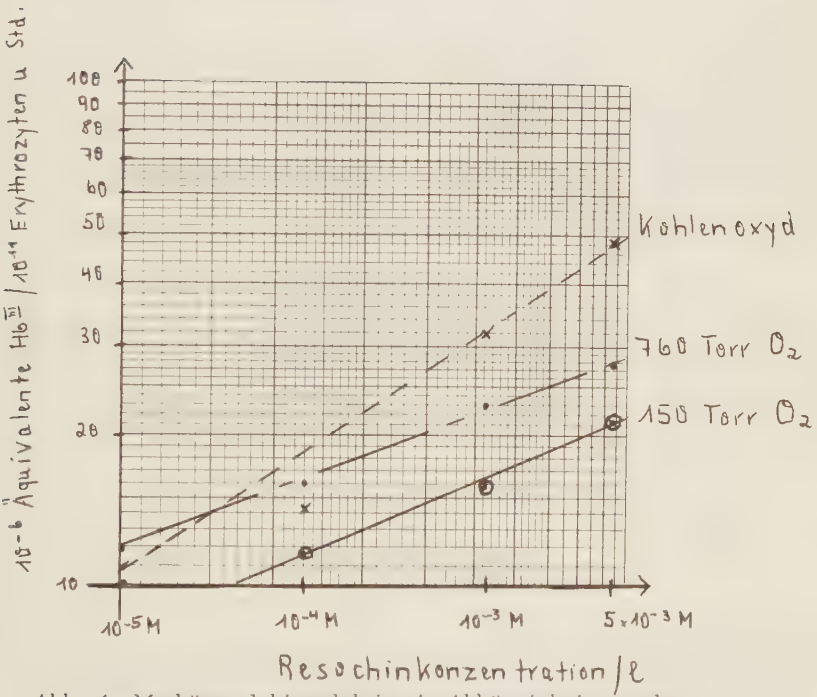

Abb. 4: Methämoglobinreduktion in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration.
Phosphat-Ringerlösung pH 7,4; 245 mg% Na-Laktat; 2,4 Mill. Erythrozyten/cmm; 37° C

Die Ergebnisse der Mittelwerte für die Methämoglobinreduktion mit Glukose oder Laktat als Substrat sind auf den Abbildungen 1 und 3 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß sowohl in den Ansätzen mit Glukosezusatz als auch in denen mit Na-Laktatzusatz unter anaeroben Bedingungen (Kohlenoxyd) die Reduktionsgeschwindigkeiten für das Methämoglobin deutlich beschleunigt werden, während die Steigerung unter Sauerstoff und Luft geringer ist und auch mit der Zeit schneller abnimmt als unter Kohlenoxyd.
Auf den Abbildungen 2 und 4 sind die Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Resochinkonzentration dargestellt. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, daß sich die Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeit unter anaeroben Bedingungen durch Zusatz von Resochin stärker als unter aeroben Versuchsbedingungen steigern läßt. Die Zunahme der Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeit ist dabei sowohl mit Laktat als auch Glukose als Substrat unter reinem Sauerstoff bzw. Luft etwa gleich. Legt man die Anfangsgeschwindigkeiten in den ersten 10 Minuten zu Grunde, so ergeben sich die in Tabelle 7 wiedergegebenen Werte.

Tabelle 7

Mittelwerte der Anfangsgeschwindigkeiten in den ersten 10 Minuten in µl O_2 bzw. CO je 2 ml Erythrozytensuspension

	Glukose	Na-Laktat
Kohlenoxyd	17,5	23,5
Sauerstoff	13,0	12,0
Luft	3,0	5,0

Die Werte zeigen, daß auch die Anfangsgeschwindigkeiten der Methämoglobinreduktion unter Kohlenoxyd wesentlich höher sind als unter Sauerstoff und Luft. Dabei sind die Anfangsgeschwindigkeiten unter Glukose- und Laktatzusatz annähernd gleich.

4. Methämoglobinbildung durch Primaquine und Resochin:

Parallel zur Messung der Stoffwechselgrößen wurden die Methämoglobinkonzentrationen vor der Inkubation, nach 10 Minuten und nach 3 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 als Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin (%) wiedergegeben.

Tabelle 8

Zeit	Met-Hb-Gehalt in %			
	vor Inkubation mit Primaquine (n = 5)	nach Inkubation ohne Primaquine (n = 5)	nach Inkubation mit 5×10^{-4} M Primaquine (n = 5)	nach Inkubation mit 1×10^{-3} M Primaquine (n = 5)
0 Min.	0,8			
10 Min.		1,2	2,8	3,4
180 Min.		1,4	8,0	15,6

Tabelle 9

Zeit	Met-Hb-Gehalt in %			
	vor Inkubation mit Resochin (n = 5)	nach Inkubation ohne Resochin (n = 5)	nach Inkubation mit 5×10^{-4} M Resochin (n = 5)	nach Inkubation mit 1×10^{-3} M Resochin (n = 5)
0 Min.	0,8			
10 Min.		1,2	2,6	3,2
180 Min.		1,2	7,0	13,4

Der Methämoglobingehalt der Erythrozyten nahm mit steigender Primaquine- und Resochinkonzentration und Inkubationsdauer zu, wobei der Methämoglobingehalt unter Primaquine etwas höhere Werte erreicht als unter Resochin.

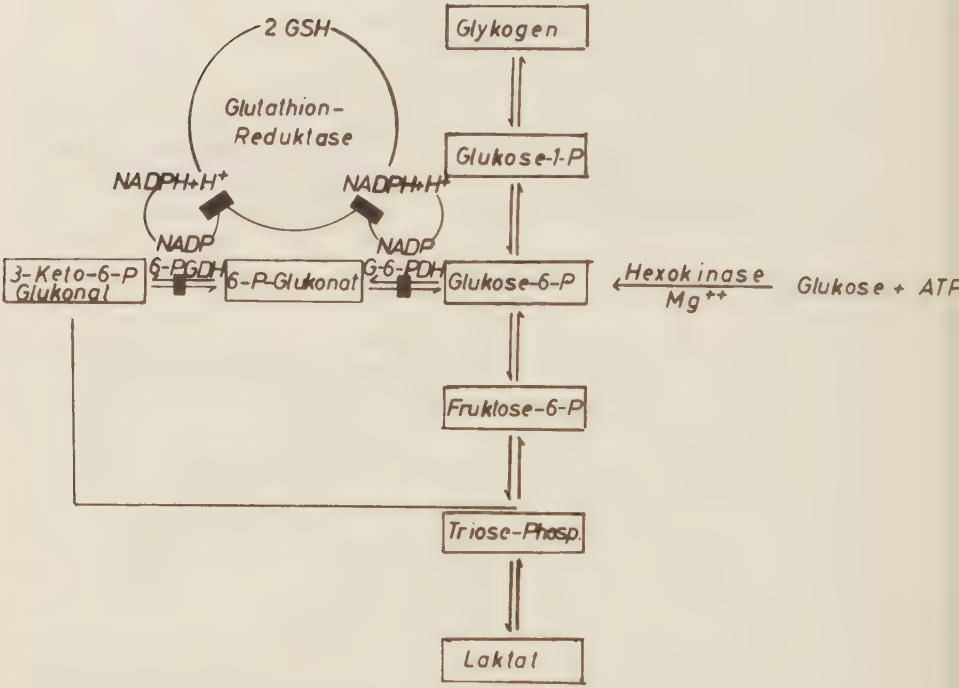

Abb. 5: Schema der Glutathion reduzierenden Reaktionen in Erythrozyten

Tabelle 10

Medikamente, die bei Glucose-6-P-Dehydrogenasemangel und Glutathionreduktasemangel eine Hämolyse ausgelöst haben

Glukose-6-P-Dehydrogenase-mangel	Glutathionreduktasemangel
Primaquine	Nitrofurantoin
Pamaquine	Primaquine
Pentaquine	Resochin
Atebrin	Azulfadine
Anilinderivate	Dapsone
Azetanilid	Chloramphenicol
Naphthalin u Derivate	Azetylsalizylsäure
Phenylhydrazin	Phenazetin
Acetylphenylhydrazin	Butazolidin
Methylenblau	Pyramidon
Phenacetin	Marcumar
Antipyrin	andere Substanzen :
Fungizide	Nitrolack
Nitrofurantoin	Thallium
Sulfanilamid	
Azetylsalizylsäure	
p-amino-Salizylsäure	
Sulfoxone	
Diasone	
Chloramphenicol	
Vitamin K u. Analoge	
Azulfadine	
Pyramidon	
Dimercaprol	
Vegetabilien	
Favabohnen	
Leguminosen	

IV. DISKUSSION

Störungen in den Glutathion synthetisierenden oder reduzierenden Reaktionen in den roten Blutzellen können Ursache einer Verminderung oder Instabilität des GSH-Gehaltes der Erythrozyten sein und für den Träger des Stoffwechseldefektes eine Gefährdung durch eine größere Anzahl von Medikamenten bedeuten. Die bisher bekannten Enzymdefekte in den Glutathion reduzierenden Reaktionen sind der Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel, 6-P-Glukonatdehydrogenase-Mangel und der Glutathionreduktase-Mangel, wie es dem Stoffwechselschema auf Abbildung 5 zu entnehmen ist. Die Medikamente, die bisher bei diesen Enzymdefektträgern zur Hämolyse oder auch zu Panzytopenie geführt haben, sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Die häufigsten Nebenwirkungen wurden bei Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangelträgern unter der Behandlung mit Antimalariamitteln, besonders aus der Gruppe der 8-Aminochinolinderivate, beobachtet. Unter der Therapie mit 4-Aminochinolinderivaten (Resochin) wurde bisher lediglich beim Glutathionreduktase-Mangel einmal eine Panzytopenie ausgelöst (WALLER et al. (4)).

Über den Mechanismus der Hämolyse ist bisher wenig bekannt. Nur das Zusammentreffen von Enzymdefekt und Medikamentenexposition führt zur Verkürzung der Erythrozytenlebensdauer. Der Enzymdefekt allein verursacht meist keine klinisch faßbare Hämolyse (Ausnahmen!), die Medikamenteneinnahme in üblicher Dosierung beim Gesunden ebenfalls nicht. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungsergebnisse über die Stoffwechselwirkungen von Primaquine (Beispiel für ein 8-Aminochinolin) und Resochin (Beispiel für ein 4-Aminochinolin) in Erythrozyten mitgeteilt, die an Blutzellen von Gesunden durchgeführt wurden. Aufgabe der Untersuchungen war es, zu prüfen, ob die Hämolyse durch Störungen des Energiestoffwechsels unter der Einwirkung der genannten Substanzen zu erklären ist.

Zunächst wurden Erythrozytensuspensionen über verschieden lange Zeit mit Glukose als Substrat unter Zusatz von Resochin und Primaquine bei 37° C inkubiert und die Laktat- und Pyruvatbildung sowie der Gehalt an energiereichen Phosphaten gemessen. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1×10^{-3} Mol und 5×10^{-4} Mol nahm die Laktatbildung ab und die Pyruvatbildung zu, so daß sich der Laktat-Pyruvatquotient unter Primaquine von etwa 17 auf 1,6 bis 2,0,

unter Resochinzusatz von etwa 16,5 auf 4,5 bis 5,0 veränderte. Die Erniedrigung des Laktat-Pyruvatquotienten war besonders bei den höheren Medikamentenkonzentrationen und bei längerer Inkubationsdauer zu beobachten. Die Gesamtsäurebildung und der ATP-Gehalt der Erythrozyten nahmen ebenfalls bei längerer Inkubation und höheren Konzentrationen von Resochin oder Primaquine etwas ab. Die Erniedrigung der Stoffwechselleistungen reicht jedoch sicher nicht aus, um einen Zusammenbruch der Zellfunktion zu bewirken. Die Erniedrigung des Laktat-Pyruvatquotienten wurde bereits früher von LÖHR und WALLER (27) unter der Einwirkung von Primaquine beobachtet. Sie war bei Erythrozyten mit Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel besonders ausgeprägt. Dasselbe wurde auch von KIESE und WALLER (22) und WALLER (52) sowie WAGNER und UEHLEKE (48) und BURGER et al. (11) für Erythrozyten von Menschen und verschiedenen Tierspezies unter der Einwirkung von Phenylhydroxylamin beschrieben. STERNSCHUSS et al. (44) konnten auch unter der Einwirkung von Azetylphenylhydrazin bei Gesunden und bei Negern mit Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel dieselbe Änderung des Laktat-Pyruvatquotienten feststellen.

Die Angaben über eine Verminderung des ATP-Gehaltes in den Erythrozyten Gesunder und Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel-Träger bei in vitro-Inkubation mit den genannten Verbindungen sind unterschiedlich. LÖHR und WALLER (27) sahen bei Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangelträgern (Kaukasier) nach Inkubation mit 3×10^{-4} M und höherer Primaquinekonzentration einen ATP-Abfall bei 4stündiger Inkubation, in normalen Erythrozyten dagegen nicht. MOHLER und WILLIAMS (33) sowie MILLS (32) beobachteten unter der Inkubation mit Azetylphenylhydrazin in vitro ebenfalls einen ATP-Abfall in den Blutzellen von Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangelträgern. Während BRUNETTI und GRIGNANI (10) bei Favismus-Kranken in der hämolytischen Krise in vivo eine ATP-Erniedrigung in den Blutzellen messen konnten, fanden BREWER und POWELL (8) unter peroraler Belastung von Negern mit Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel mit Primaquine keinen Abfall des ATP. Die Unterschiede lassen sich vielleicht dadurch erklären, daß bei Negern die Glukose-6-P-Dehydrogenaseaktivität auch bei den homozygoten Defektträgern nicht unter 15 % der normalen Aktivität absinkt, während die Aktivitäten bei Kaukasiern unter 1% der Normalwerte liegen können.

Die Ursache der Erniedrigung des Laktat-Pyruvatquotienten in den Inkubationsansätzen mit Primaquine ist nach früheren Untersuchungen von LÖHR und WALLER (27) in einer Oxydation der reduzierten Pyridinnukleotide zu suchen. Die Geschwindigkeit der Abnahme des Reduktionsgrades der Pyridinnukleotide ist abhängig von der Gegenwart von Sauerstoff und von der Primaquinekonzentration im Ansatz. Sie läßt sich im isolierten System durch Schwermetallionen, besonders Kupferionen, weiter beschleunigen. LÖHR und WALLER (27) konnten

in vitro zeigen, daß der Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide in normalen Erythrozyten durch Primaquine in 2 - 3 millimolarer Konzentration nach 4stündiger Inkubation bei 37,9° C für das NAD-System von 9 auf 4% und für das NADP-System von 55 auf 33% zurückgeht, während in Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangelerythrozyten keine reduzierten Pyridinnukleotide mehr nachweisbar waren. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Zusatz von Resochin (Chloroquine) ebenfalls eine Beschleunigung der Oxydation von NADH und NADPH nachgewiesen werden. Der Zusatz von Hämolysaten steigerte die Oxydationsgeschwindigkeit weiter. WAGNER und UEHLEKE (48) machten nach Zusatz von Phenylhydroxylamin zu Erythrozytensuspensionen dieselbe Beobachtung. Während LÖHR und WALLER (27) in ihren Ansätzen mit Primaquine das verschwundene NADH und NADPH fast quantitativ als NAD und NADP wiederfanden, konnten WAGNER und UEHLEKE (48) in ihren Versuchen mit Phenylhydroxylamin keinen äquivalenten Anstieg der oxydierten Pyridinnukleotide feststellen. Sie diskutieren daher eine direkte Reaktion zwischen Phenylhydroxylamin und Pyridinnukleotiden. Die Hemmung der Laktatdehydrogenase, Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase und der Glukose-6-P-Dehydrogenase durch die Medikamente konnte als Ursache für die Verschiebung des Redoxstatus ausgeschlossen werden (WALLER und BENÖHR (58 in Vorbereitung)).

Die Verminderung der Glykolyse bei längerer Inkubation mit Resochin, Primaquine, Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin läßt sich bisher nicht sicher erklären. Zu diskutieren ist einmal ein starker Anstau von Pyruvat und als Folge davon ein weiterer Anstieg der vorgeschalteten Metabolite, wie er von LÖHR und WALLER (27) nachgewiesen wurde. Dieser Aufstau allein reicht aber nicht aus, um die Glykolyse wesentlich zu hemmen. KOSOWER, VANDERHOFF und LONDON (22b) konnten in Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangelzellen unter der Inkubation mit Azetylphenylhydrazin parallel zum GSH-Abfall eine Hemmung der Hexokinasereaktion feststellen. Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen von NESBAKKEN und ELDJARN (34) sowie ELDJARN und BREMER (15) überein, die durch den Zusatz von Disulfiden die Hexokinaseaktivität von Blutzellen und verschiedener anderer Gewebe herabsetzen konnten und in Abhängigkeit von der Aktivitätsminderung auch eine Erniedrigung der Glykolyserate beobachteten. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen auf eine Inaktivierung der Hexokinase durch Bildung von gemischten Disulfiden des GSSG mit den SH-Gruppen des Enzyms. SCHEUCH, RAPOPORT und BARTHEL (38) sowie SCHEUCH, WAGENKNECHT, WAGNER und HYKES (40) sahen unter der Inkubation der Erythrozyten mit Hydroxylamin ebenfalls einen GSH-Abfall mit Erniedrigung der Hexokinaseaktivität und Glykolyserate. Sie vermuteten die Inaktivierung des Enzyms durch GSSG unter Zwischenschaltung von Radikalen. Der GSH-Abfall ist in Blutzellen mit Störung der Glutathion reduzierenden Reaktionen

oder der Glutathionsynthese besonders stark (BEUTLER (4)) unter der Einwirkung der genannten Medikamente, die entweder selbst oder nach ihrer Metabolisierung zu chinoiden Zwischenprodukten (unter Bildung von Peroxyden?) SH-Gruppen von Enzymen und des Hämoglobins, reduzierte Pyridinnukleotide und Wasserstoffbrücken der Membranen oxydieren. Durch den Mangel an GSH fehlt diesen Verbindungen nicht nur der Schutz gegen Oxydationsprozesse, sondern nach SCHNEIDER und FLOHÉ (41), COHEN und HOCHSTEIN (13) sowie MILLS (30) ist auch die besonders für die Zerlegung niedriger H_2O_2-Konzentrationen wichtige Glutathionperoxydase in ihrer Aktivität herabgesetzt.

Die Steigerung der Methämoglobinreduktionsgeschwindigkeit, die wir ausgiebig unter Zusatz von Resochin studiert haben, stimmt mit den Beobachtungen von LÖHR und WALLER (27) an Ansätzen mit Primaquinezusatz überein. Die stärkste Erhöhung der Methämoglobinreduktion, die abhängig von der Resochinkonzentration ist, wurde unter anaeroben Bedingungen beobachtet. Sie war mit Laktat als Substrat etwas stärker als mit Glukose. Auch diese Beobachtungen sprechen dafur, daß ein chinoides Oxydationsprodukt des Primaquines bzw. Resochins gebildet wird, das die Übertragung des Wasserstoffs vom NADH auf Methämoglobin katalysiert. Wahrscheinlich sind unter anaeroben Versuchsbedingungen nur das Methämoglobin und unter aeroben Bedingungen Methämoglobin und Sauerstoff der Wasserstoffakzeptor. Neben den genannten Stoffwechselvorgängen läuft die Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin durch Primaquine und ähnliche Verbindungen ab (BEUTLER et al. (5)), wie auch in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte. Die Methämoglobinkonzentration, die gebildet wird, ist dabei abhängig von der Primaquine- bzw. Resochinkonzentration und der Inkubationsdauer für die Ansätze. Der genaue Mechanismus für die Methämoglobinbildung durch Primaquine ist noch nicht bekannt. Für die katalytische Methämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin konnten KIESE und WALLER (22) eine gekoppelte Oxydation von Phenylhydroxylamin zu Nitrosobenzol und Hämoglobin zu Methämoglobin unter Bildung von Wasserstoffperoxyd wahrscheinlich machen. Nitrosobenzol wird nun über NADPH und eine spezifische NADPH-Oxydase (KIESE und WALLER (22)), BURGER et al. (11) wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert, so daß der Kreisprozeß von neuem ablaufen kann (siehe auch SZEINBERG und MARKS (45)).

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, daß die Wirkungen von 8-Aminochinolin- und 4-Aminochinolinderivaten auf den Kohlenhydratstoffwechsel und die Methämoglobinreduktion in den Blutzellen sehr ähnlich sind, obwohl nur 8-Aminochinolinderivate bei Kranken mit Glukose-6-P-Dehydrogenase-Mangel eine Hämolyse auszulösen vermögen. Die aufgezeigten Stoffwechselveränderungen führen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu einer kriti-

schen ATP-Verminderung in den Zellen, so daß das Eintreten einer Hämolyse unter der Einwirkung der genannten Verbindungen nicht allein mit der Kohlenhydratstoffwechselstorung erklart werden kann. Nach MILLS (31) kommt wahrscheinlich der Oxydation von Stroma-SH-Gruppen besonders bei Kranken mit GSH-Mangel in den Blutzellen eine größere Bedeutung zu. Sie dürfte zu einer verstärkten Sequestration und damit zur Phagozytose der Erythrozyten im retikuloendothelialen System führen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

An Erythrozytensuspensionen gesunder Probanden wurden unter Zusatz von Primaquine bzw. Resochin der Laktat-Pyruvatquotient und die energiereichen Phosphate bestimmt. Unter steigender Medikamentenkonzentration und Inkubationsdauer kam es zu einem Abfall des Laktat-Pyruvatquotienten, wobei unter Primaquine der Abfall starker war als unter Resochin. Eine starkere Änderung des ATP-Gehaltes wurde bei den verwendeten Medikamentenkonzentrationen nicht beobachtet.

Im isolierten System kam es unter Zusatz von Resochin zu einer Beschleunigung der Oxydation der reduzierten Pyridinnukleotide. Die Geschwindigkeit der Abnahme des Reduktionsgrades war von der Gegenwart von Sauerstoff und der Resochinkonzentration abhangig. Unter Zusatz von Hämolysaten ließ sich die Oxydationsgeschwindigkeit weiter steigern.

Der Zusatz von Resochin zu nitrierten Erythrozytensuspensionen bewirkte eine von der Resochinkonzentration abhangige Steigerung der Methamoglobinreduktionsgeschwindigkeit, die unter anaeroben Bedingungen ihre höchsten Werte erreichte.

Unter Primaquine und Resochin kam es zu einer Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin. Die gebildete Methamoglobinkonzentration war von der Primaquine- bzw. Resochinkonzentration und der Inkubationsdauer abhangig.

Das Auftreten einer Anämie unter der Wirkung von Primaquine und Resochin kann auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit und auch anderer Autoren nicht allein mit der Storung im Kohlenhydratstoffwechsel erklärt werden. Wahrscheinlich kommt der Oxydation von Stroma-SH-Gruppen, besonders bei GSH-Mangel in den Blutzellen, eine größere Bedeutung zu, die zu einer verstärkten Sequestration und damit auch Phagozytose der Erythrozyten im retikuloendothelialen System führen dürfte.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ALLEN, D.W. and J.H. JANDL: Oxydative hemolysis and precipitation of hemoglobin II. Role of thiols in oxidant drug action.
J. clin. Invest. 40, 454 - 475 (1961)

(2) ANNY, A.C.: Hemoglobinuria a new problem on the Indian frontier.
J. Roy Army Corps 62: 178 - 191, 269 - 278, 318 - 329 (1934)

(3) BENESCH, R.E. and R. BENESCH: Relation between erythrocyte integrity and sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. 48, 38 - 42 (1954)

(4) BEUTLER, Ernst: The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review.
Blood 14, 103 - 139 (1959)

(5) BEUTLER, E., M.C. BALUDA and B.M. KELLY: The role of methemoglobin in the mechanism of drug-induced hemolytic anemia.
Proc. IXth Congress Internat. Soc. Hematol. 1962, Mexico City

(6) BEUTLER, E., R.J. DERN and A.S. ALVING: The hemolytic effect of primaquine III. A study of primaquine-sensitive erythrocytes.
J. Lab. clin. Med. 44, 177 - 184 (1954)

(7) BOIVIN, P. et C. GALAND: La Synthèse Du Glutathion Au Cours De L'Anémie Hémolytique Congénitale Avec Déficit En Glutathion Réduit.
Nouv. Rev. Franc. Hemat. 5, 707 - 720 (1965)

(8) BREWER, G. J. and R.D. POWELL: The adenosine triphosphate content of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient and normal erythrocytes, including studies of a glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient man with elevated erythrocyte ATP.
J. Lab. Clin. Med. 67, 726 - 741 (1966)

(9) BREWER, George J., A.R. TARLOV, R.W. KELLERMEYER and A.S. ALVING: The Hemolytic effect ofprimaquine XV. Role of methemoglobin.
J. Lab. clin. Med. 59, 905 - 917 (1962)

(10) BRUNETTI, P. e F. GRIGNANI: Il Compartamento dell' ATP, dell' ADP e dell' AMP degli Erithrocite neö Favismo.
Rass. Med. Sarda 60, 413 (1958)

(11) BURGER, A., J. WAGNER, H. UEHLEKE u. E. GÖTZ: Beeinflussung von Pentosephospharcyclus und Glykolyse in Erythrozyten während Methämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 256, 333 - 347 (1967)

(12) CARSON, P.E., C.L. FLANAGAN, C.E. ICKES and A.S. ALVING: Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes.
Science 124, 484 - 485 (1956)

(13) COHEN, G. and P. HOCHSTEIN: Glukose-6-Phosphate Dehydrogenase and Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes.
Science 134, 1756 - 1757 (1961)

(14) CORDES, W.: Experiences with plasmochin in malaria (prelim. Rep.) 15th Annual Report, United Fruit Co. (Med. Dept.), 66 - 71 (1926)

(15) ELDJARN, L. and J. BREMER: The inhibitory effect at the hexokinase level of disulphides on glucose metabolism in human erythrocytes.
Biochem. J. 84, 286 (1962)

(16) FICACCI, L.: Emoglobinuria da plasmochina.
Policlinico 42, 136 - 139 (1935)

(17) GROSS, R.T. and P.A. MARKS: An Hereditary Enzymatic Defect In Red Blood Cells: Its Relation To Certain Drug-Induced Hemolytic Anemias.
New York Acad. of Sciences 75, 106 - 109 (1958)

(18) JAFFÉ, E.R.: The reduction of methemoglobin in erythrocytes of a patient with Congenital Methemoglobinemia, subjects with Erythrocyte Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Deficiency, and normal individuals.
Blood 21, 561 - 572 (1963)

(19) JANATA, V. u. J. WAGNER: Der verschiedene Mechanismus der Hydroxylamin- und Phenylhydroxylaminwirkung auf den Stoffwechsel der Erythrozyten.
Fol. Haematol. Lpzg. Sonderheft IV. Internat. Erythrozytensymp., 420 - 425 (1965) Berlin.

(20) JANDL, J.H., L.K. ENGEL and D.W. ALLEN: Oxydative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging.
Clin. Invest. 39, 1818 - 1836 (1960)

(21) KELLERMEYER, R.W., A.R. TARLOV, S.L. SCHRIER, P.E. CARSON and A.S. ALVING: The hemolytic effect of primaquine XIII. Gradient susceptibility to hemolysis of primaquine-sensitive erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 58, 225 - 233 (1961)

(22) KIESE, M. und H.D. WALLER: Kinetik der Hämiglobinbildung VII. Mitt. Die Stoffwechselvorgänge in roten Zellen bei der Hämiglobinbildung durch den Kreisprozeß Phenylhydroxylamin-Nitrosobenzol.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 211, 345 - 361 (1950)

(22a) KIESE, M.: Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämiglobin und Hämoglobin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 190 (1947)

(22b) KOSOWER, N.S., G.A. VANDERHOFF and J.M. LONDON: Hexokinase activity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes.
Nature 201, 684 - 685 (1964)

(23) LARIZZA, P.: Enzymopenische hämolytische Anämien.
Z. klin. Med. 156, 287 (1960)

(24) LÖHR, G.W., P. BAUM, G. KAMM: Toxische hämolytische Anämien.
Med. Klinik 58, 2111 - 2120 (1963)

(25) LÖHR, G.W. u. Ch. LAUSECKER: Zit. nach G.W. Löhr: Die enzymopenischen Erythropathien.
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 70, 495 - 521 (1964)

(26) LÖHR, G.W. u. H.D. WALLER: Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel.
Med. Klinik 57, 1521 - 1525 (1962)

(27) LÖHR, G.W. u. H.D. WALLER: Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen hämolytischen Anämien.
Dtsch. med. Wschr. 86, 27 - 29 und 87 - 93 (1961)

(28) LÖHR, G.W. u. H.D. WALLER: Hämolytische Erythropathie durch Fehlen von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in roten Blutzellen als dominant vererbliche Krankheit.
Klin. Wschr. 36, 865 - 869 (1958)

(29) MANIFOLD, J.A.: Report on a trial of plasmoquine and quinine in the treatment of benign tertain malaria.
J. Roy Army M. Corps 56, 321 - 338 (1931)

(30) MILLS, G.C.: Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxyde in animal tissues.
Arch. Biochem. 86, 1 (1960)

(31) MILLS, G.C.: Drug-induced hemolytic anemia. A review of some biochemical aspects of the disease.
Texas Rep. Biol. Med. 21, 487 - 495 (1963)

(32) MILLS, G.C.: Effect of acetylphenylhydrazine (APH) on erythrocyte metabolism.
Fed. Proc. 22, 356 (1963)

(33) MOHLER, D.N. and W.J. WILLIAMS: The effect of phenylhydrazine on the adenosine-triphosphate content of normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient human blood.
J. clin. Invest. 40, 1735 (1961)

(34) NESBAKKEN, R. and L. ELDJARN: The inhibition of hexokinase by disulfides.
Biochem. J. 87, 526 - 532 (1963)

(35) OORT, M., J.A. LOOS, M.K. PRINS: Hereditary absence of reduced glutathione in the erythrocytes - a new clinical and biochemical entity?
Vox. Sang. (Basel) 6, 370 - 373 (1961)

(36) PRINS, H.K., M. OORT, J.A. LOOS, C. ZÜRCHER and Th. BECKERS: Hereditary absence of glutathione in the erythrocytes. Biochemical, haematological and genetical studies.
Prox. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon 1963

(37) RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie, 2. Auflage Berlin: VEB-Verlag Volk und Gesundheit 1964

(38) SCHEUCH, D., S. RAPOPORT u. J. BARTHEL:
Acta biol. med. germ. 7, 113 (1961)

(39) SCHEUCH, D., K.H. JACOBASCH, A. HÄNEL u. C. WAGENKNECHT: Der Einfluß von Methylenblau auf das Glutathion und die Aktivität einiger SH-Enzyme.
Acta biol. med. germ. 11, 616 - 627 (1963)

(40) SCHEUCH, D., C. WAGENKNECHT, J. WAGNER u. P. HYKES: Über den Einfluß des Hydroxylamins auf den Stoffwechsel von roten Zellen.
Acta biol. med. germ. 10, 459 - 467 (1963)

(41) SCHNEIDER F. u. L. FLOHÉ: Untersuchungen über die Glutathion: H_2O_2-Oxydoreduktase (Glutathion-Peroxydase).
Hoppe-Seyler's Ztsch. Physiol. Chem. 348, 540 - 552 (1967)

(42) SCIALOM, C., Y. NAJEAN et J. BERNARD: Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire avec déficit incomplet en 6-phosphogluconate deshydrogenase.
Nouv. rev. Franc. d'hémat. 69, 452 (1966)

(43) SEIN, M.: Case of hemoglobinuria caused by plasmochin, taken as prophylactic against malaria.
Indian Med. Gaz. 72, 86 - 87 (1937)

(44) STERNSCHUSS-KOSOWER, N.J., G.A. VANDERHOFF, E.R. JAFFÉ and I.M. LONDON: Metabolic changes in normal and G-6-PDH deficient erythrocytes induced by acetylphenylhydrazin.
Clin. Invest. 42, 1025 - 1030 (1963)

(45) SZEINBERG, A. and P.A. MARKS: Substances stimulating glucose catabolism by the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes.
J. clin. Invest. 40, 914 (1961)

(46) SZEINBERG, A., C. SHEBA, N. HIRSCHORN and E. BODONYI: Studies on erythrocytes in cases with past history of favism and drug-induced acute hemolytic anemia.
Blood 12, 603 - 613 (1957)

(47) WAGNER, J., P. HYKES, V. JANATA u. K. KÁCL: Die Wirkung von Hydroxylamin und Phenylhydroxylamin auf die GSH-Konzentration und die Bedeutung für den Stoffwechsel der Erythrozyten.
Act. Biol. et med. germ. (Suppl. Bd. III), 312 - 319 (1964)

(48) WAGNER, J. u. H. UEHLEKE: Die Wirkung des Phenylhydroxylamins auf NADH und NADPH in Erythrozyten.
Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmakol. exp. Path. 254, 381 - 387 (1966)

(49) WAGNER, J., A. BURGER, G. STÖFFLER, u. H. UEHLEKE: Regulierende Faktoren der Methämoglobinbildung durch Phenylhydroylamin bei verschiedenen Tierarten.
Vortrag Jahrestagung der AG. Biochemie. Ges. Exper. Med. der DDR (1965), Magedeburg.

(50) WAGNER, J., A. DAVID u. J. SRBOVÁ: Glykolyse und GSH-Gehalt in Erythrozyten bei Methämoglobin-bildenden Stoffen in vitro.
Fol. Haematol. (Lpzg) 78, 393 - 400 (1962)

(51) WAGNER, J. u. V. JANATA: Über das gebundene Glutathion in den Erythrozyten.
Fol. Haematol. (Lpzg.) Sonderheft IV. Internat. Erythrozytensymp. 416 - 419 (1965) Berlin.

(52) WALLER, H.D.: Mechanismus der Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin.
Inauguraldissertation Kiel, 1950

(53) WALLER, H.D., G.W. LÖHR und M. TABATABAI: Hämolyse und Fehlen von Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen.
Klin. Wschr. 35, 1022 - 1027 (1957)

(54) WALLER, H.D. u. W. GEROK: Schwere strahleninduzierte Hämolyse bei hereditärem Mangel an reduziertem Glutathion in den Blutzellen.
Klin. Wschr. 42, 948 - 954 (1964)

(55) WALLER, H.D., G.W. LÖHR, E. ZYSNO, W. GEROK, D. VOSS u. G. STRAUSS: Glutathionreduktase-Mangel mit hämatologischen und neurologischen Störungen.
Klin. Wschr. 43, 413 - 426 (1965)

(56) WALLER, H.D.: Glutathione reductase deficiency.
Referat I. Internat. Symp. "Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism", City of Hope Medical Center Duarte/Calif. Feb. 1967, Grune u. Stratton, Inc. 1968, S. 185 - 204

(57) WALLER, H.D., J. BREMER, H. SCHÖNTHAL u. W. DOROW: HbC-Homozygotie mit Glutathionreduktase-Mangel in Blutzellen. Klin. Wschr. 16, 824 - 826 (1967)

(58) WALLER, H.D. u. H.Ch. BENÖHR: in Vorbereitung.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. H.E. Bock dafür danken, daß ich die Arbeit in seiner Klinik anfertigen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.D. Waller für die Überlassung des Themas sowie für die vielen guten Ratschläge, die er mir bei dem Abfassen der Arbeit zuteil werden ließ.

Lebenslauf

Am 25.9.1937 wurde ich, Sieglinde Lüer, geb. Baßler, in Zeulenroda/Thür. geboren. Von 1943 bis 1951 besuchte ich die Grundschule in Zeulenroda. Da man mir den Besuch der Oberschule verwehrte, begann ich im Herbst 1951 mit einer kaufmännischen Lehre, die ich auch nach der Übersiedlung unserer Familie nach West-Berlin im Jahre 1952 dort fortsetzte. Von 1955 bis 1960 besuchte ich neben meiner Tätigkeit als kaufmännische Angestellte das Berliner Abendgymnasium. Im Mai 1960 bestand ich die Reifeprüfung. Im Herbst 1960 begann ich mit dem Medizinstudium an der Erlanger Universität, wo ich 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1963 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1963/64 an studierte ich an der Universität in Tübingen. Im Februar 1966 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.